

総 説（教授就任記念講演）

細胞生物学からのアプローチ

米 村 重 信

徳島大学大学院医歯薬学研究部細胞生物学分野

（平成29年11月 8 日受付）（平成29年11月24日受理）

はじめに

形態学を基盤とする基礎研究を行っているので、専門分野の研究内容について詳しく述べるよりも、手法的なことを紹介することで多くの人に私の研究分野に関心を持っていただけるかと考えた。この就任講演では特に免疫蛍光染色による新しい固定法の導入、培養上皮細胞の形態形成の顕微鏡下での実験法など、方法の紹介から、研究内容に触れていこうと思う。

タンパクのリン酸化を細胞の中で捉える

例としてあげるタンパクはERM ファミリー（ezrin/radixin/moesin ファミリー）のタンパクである。このタンパクは細胞骨格の代表でもあるアクチンフィラメントにそのC末で結合しうる。一方、膜タンパクとはN末で結合できる。そのため、アクチンフィラメントと細胞膜とを連結するリンカーであると考えられていた。しかし、単離してきたERM タンパクは、N末とC末との分子内の相互作用により不活性状態になっていると考えられ、膜タンパクともアクチンフィラメントとも結合しない。分子を切断してN末、C末とに分ければ、上記の性質を見ることができる。細胞内では微絨毛のようにアクチンフィラメントの束が細胞膜に接している領域に局在することから、何らかの活性化が起こっているはずである。1990年代後半には、ERM タンパクのC末の特定のスレオニンがリン酸化することと活性化が関係するとみなされていた^{1,2)}。私たちはその部位のリン酸化を特異的に認識するモノクローナル抗体を作り出していた。通常の培養細胞では、ウエスタンブロッティングによると十分にリン酸化が認められていた。しかし、リン酸化に関わらずERM タンパクを認識する抗体による細胞染

色では微絨毛などに強い濃縮が見られるものの、リン酸化を特異的に認識する抗体では、細胞内では染色が見られなかった。当時リン酸化することでERM タンパクは活性化し、リンカーとして働くと考えられていた（その後、PIP2によって活性化するとリン酸化されやすくなり、リン酸化されると安定して活性状態を保つことがわかった（図1）³⁾。それを細胞染色により検証することができず、これではせっかく作ったモノクローナル抗体が十分に活かしていない。

細胞染色の際に行う固定によってタンパクが変性し、不溶性となり細胞のその場に止まるわけだが、変性に伴い抗体が認識するエピトープが修飾を受けて構造が変化したり、エピトープが内部に隠れて抗体がアクセスできなくなったり、あるいは目的とするタンパクが十分に固定されずに流出してしまえば、細胞染色はうまくいかないだろう。またウエスタンブロッティングが可能な抗

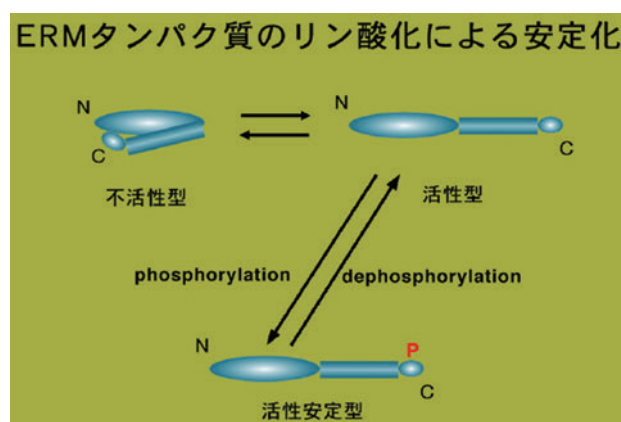


図1：ERM タンパクはN末とC末が結合して不活性状態を取るが、シグナルにより活性化する。活性化したERM タンパクはリン酸化を受けると活性状態が安定化する。

体は SDS 変性したタンパクについて結合できるということを示しているだけで、固定剤による変性をしたタンパクに結合できるかどうかはそもそもわからない。私は当時の大学院生の林研とこの問題に取り組むことにし、いくつかの固定法を試してみた。エタノールやアセトンなどの有機溶媒、ホルムアルデヒド（1–4 %）では全く染まらない。しかし、当時固定剤として使い始めたトリクロロ酢酸（TCA）を用いると美しく明るく染まり、微絨毛への局在が明瞭だった（図2）。

TCA は生化学では多くのタンパクを変性、沈殿させるために古くから使われており、組織学では樹脂包埋した試料を切削するときの固さの調節のために使用されることがあったが、免疫染色で意図的に使われることはなかった。ただ都合よく染まるというだけでなく、その機序を知ることができれば使用の正当性、応用範囲、限界もわかるだろう。免疫染色のために固定、その後の処理を行った培養細胞を SDS サンプルバッファーで溶かし、電気泳動、ウエスタンブロッティングを行った。有機溶媒や 1–4 %ホルムアルデヒドで固定した培養細胞には ERM タンパクは含まれていたが、リン酸化 ERM はそれを認識するモノクロナル抗体では検出できなかった。培養細胞を未固定のまま SDS サンプルバッファーに溶かしてウエスタンブロッティングを行うとリン酸化 ERM は検出される。すなわち、本来リン酸化 ERM が

あるのに固定後、検出できない状態になっていると考えられる。TCA 固定（10% TCA 水溶液）の場合はウエスタンブロッティングでもきちんと検出された。ではなぜ、例えばメタノール固定ではリン酸化 ERM が検出されないのだろうか。免疫染色通りにメタノール固定後、PBS で洗浄してからウエスタンブロッティングを行うとリン酸化 ERM は検出されないが、メタノール固定後風乾し（PBS 洗浄のステップを省略）、ウエスタンブロッティングを行うと検出されたことから、PBS 洗浄の過程でリン酸化 ERM が失われたと考えられる。TCA 固定し脱膜した細胞を、メタノール固定後の細胞を洗浄した PBS に漬けるという処理を行うと ERM タンパク自体の量は変化しなかったが、リン酸化 ERM は細胞染色でもウエスタンブロッティングでも検出されなくなった（図3）。すなわち、メタノール固定の場合、PBS 洗浄時に活性のあるフォスファターゼが溶出し、脱リン酸化を行うことが明白となった。ホルムアルデヒドの場合は実験的な証拠はないが、アルデヒド基がタンパクのアミノ基と結合するため、エピトープ近くの分子構造自体が変化し、抗体との結合能が落ちたことが想像される。

TCA はどんな固定をしているのだろうか。そもそも生化学において強力にタンパクを変性させるが、その仕組みは以下の通りという報告がある。それは塩素が炭素に 3 原子くっついていて（トリクロロ）かなり大きいに

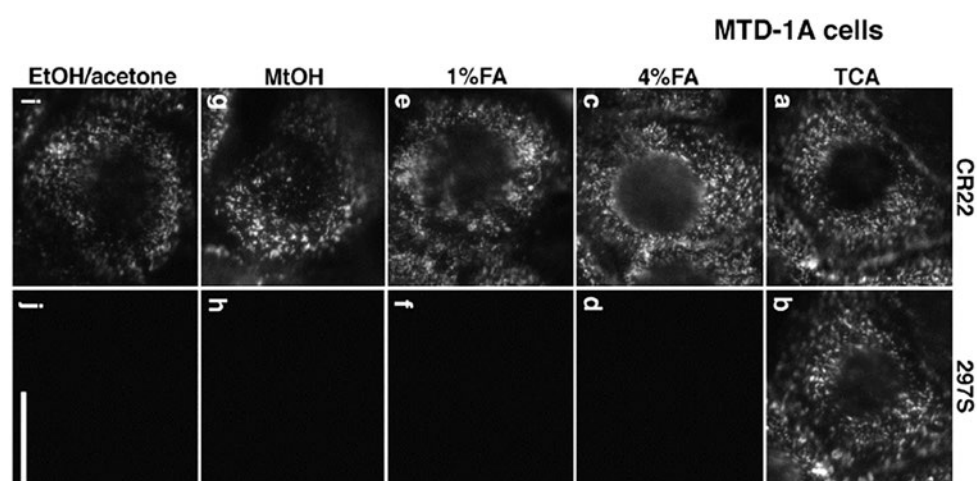


図2：ERM タンパク C 末リン酸化特異的モノクロナル抗体297S は TCA 固定された細胞でのみ染色に使用できた。アクチンフィラメントと細胞膜とが近接している微絨毛への濃縮が見られる。EtOH（エタノール）、MtOH（メタノール）、FA（ホルムアルデヒド）による固定ではほとんど染色されない。上段 CR22 抗体は ERM タンパクのうちモエシンをリン酸化に関わらず認識する⁵⁾。バー、20um

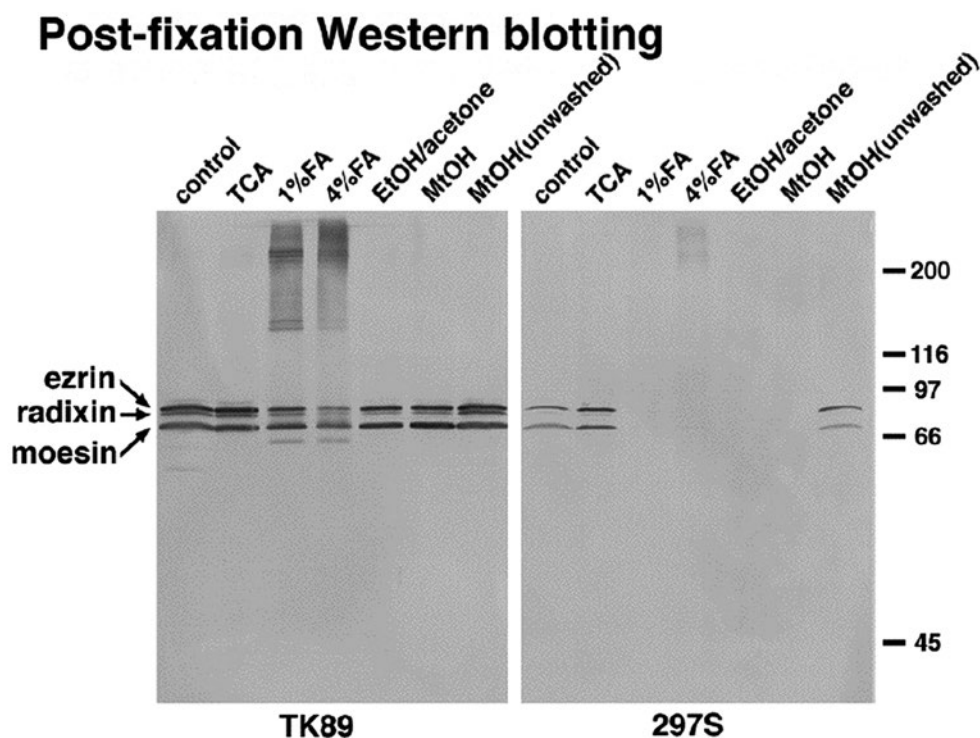


図3：免疫染色用に固定し、脱膜処理した細胞のウェスタンブロッティング。TCA 固定ではリン酸化が検出されるが、ホルムアルデヒド、メタノールなどでは検出されない（ERM タンパク全てをリン酸化に関わらず認識する TK89抗体では ERM タンパク自体は検出されている）。メタノール固定後 PBS で洗浄していない細胞ではまだリン酸化が見られる（最も右のレーン）⁵⁾。

もかわらず、電離していないということで、タンパク内部のペプチド結合領域に疎水的に結合し、ペプチド結合の結合水を除去してしまい、水を奪われたタンパクが正常な構造を取ることができなくなり、不溶性となるというものである⁴⁾。脱水という意味では有機溶媒と同じようだが、一般に有機溶媒による脱水はタンパクにとってはそれほど強い変性とならず、不溶性となるものの、水を加えれば、再び正常な構造に戻るタンパクも多い。それに比べて、TCA は10%水溶液という水がたっぷりの状態でペプチド結合部分の脱水を起こすということで、かなり特殊な作用を持つと言えるだろう。また、化学結合を作るわけではないので、ホルムアルデヒドなどと異なり、エピトープを破壊することもない。有機溶媒とは異なる脱水の仕方で、さらに強い変性をもたらすということは、有機溶媒やホルムアルデヒドによる変性では露出しないエピトープが露出するということもありうる。今回の場合はエピトープを破壊しないこと、またフォスファターゼを失活させるのでリン酸化が保たれやすかつ

た、という理由で細胞染色が可能だったと考えられる。あるいは、どんなリン酸化認識抗体についても非常に良い固定法なのかと考えて、多数の抗体（チロシンリン酸化を認識するものも含む）を試してみたが、抗体によっては TCA 固定と遜色なく他の固定法でも染色されるものもあり、TCA 固定が常にアドバンсを持っていたとは思えなかった。リン酸化している場所によりけりということなのだろう。また、おそらくフォスファターゼにもいろいろあるのか、有機溶媒固定後でも必ずしも脱リン酸化が起こらないようなリン酸化部位もあった。

手法だけでなく、科学的に ERM タンパクのリン酸化と細胞内局在の関係の解析結果を述べると、予想通り、細胞膜とアクチンフィラメントとのリンカーとなっているものはよくリン酸化されていた。細胞質に見られる ERM タンパクは当然そのリンカーの役割は果たしていないと思われるが、リン酸化の程度も低かった。また、組織においては TCA によってできるだけ早くフォスファターゼを失活させないとリン酸化の検出はできず、

小腸などでは吸収上皮の微絨毛におけるリン酸化を検出するためには小腸内腔を TCA で灌流する必要があった⁵⁾。

新しい固定法から細胞の分裂の仕組みがわかってきた

先に述べた TCA 固定は低分子量タンパク、Rho の細胞内局在を抗体を使って可視化するのにも必須の固定法であった。これを最初に見つけたのは現徳島大学藤井節郎記念医科学センター教授、当時愛知県がんセンター研究員の小迫さんであった。私たちは他の固定法と比較するなどして TCA 固定が最適であることを確認した。また Rho は細胞質分裂における分裂溝に濃縮するが (図 4)、細胞に発現させたタグ付きの Rho では濃縮が見られないなど、タグ付きのタンパクが必ずしも内在性のタンパクと同じ局在を示さないことにも気がついた⁶⁾。例えば、GFP タグ付きの Rho は分裂溝を避け、濃縮しない。このように内在性の Rho が分裂溝に濃縮することが見えたことから、もともと私の主要なテーマの一つであった細胞質分裂の機構を、この Rho の可視化を軸に解き明かそうと考えた。

Rho はその下流でモータータンパクミオシン II を活性化し、分裂溝での収縮運動を引き起こす。Rho の阻害剤による不活化によって分裂は停止する^{7,8)}、ミオシン II の不活化でも分裂は停止する⁸⁾。しかし、Rho が何の

シグナルによって分裂溝で作用するのかはわかっていなかった。そもそも Rho の局在がわかっていなかったもので、細胞全体で Rho の活性が変化するのか、Rho は分裂溝の位置が決定されてから分裂溝に濃縮してそこで活性を発揮するのか、あるいは Rho が濃縮することが分裂溝の位置決定の本質なのかなど分からないことが多かった。古くから分裂溝の位置は分裂装置を構成する微小管が決定することが知られていた。その微小管に関連するタンパク、Rho の活性に参与するタンパクが分裂溝の進行に重要であることの報告がされるようになってきたが、Rho が微小管と関係して、いつ、どこに、何によって集まるのかなどは、Rho の局在が可視化されていなかったためわからなかった。これらの疑問は Rho を可視化することで解決する可能性があり、当時の研究員の西村有香子が研究を行った。その結果、分裂溝の位置を決める微小管の先端には微小管上を動くモータータンパクを含むタンパク複合体がまず濃縮し、それが細胞膜と接した場所に Rho を直接活性化する ECT2 というタンパクを濃縮させ、その結果 Rho が予定分裂溝領域に集積する。集積した Rho がミオシン II を活性化し分裂溝が形成、進行していく、という現在理解されている枠組みが明らかになった (図 5)⁹⁾。

TCA固定をしたHeLa 細胞におけるRhoAの局在 予定分裂域に集積

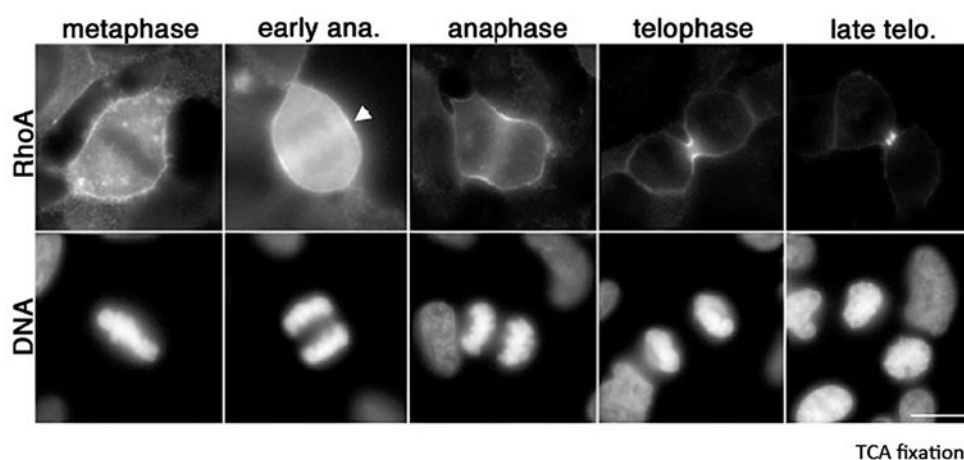


図4：TCA 固定をした HeLa 細胞における RhoA の局在⁹⁾。予定分裂域に集積する。細胞分裂中期 (metaphase) から終期 (telophase) の終わりまでの変化を示す。バー、10 μ m

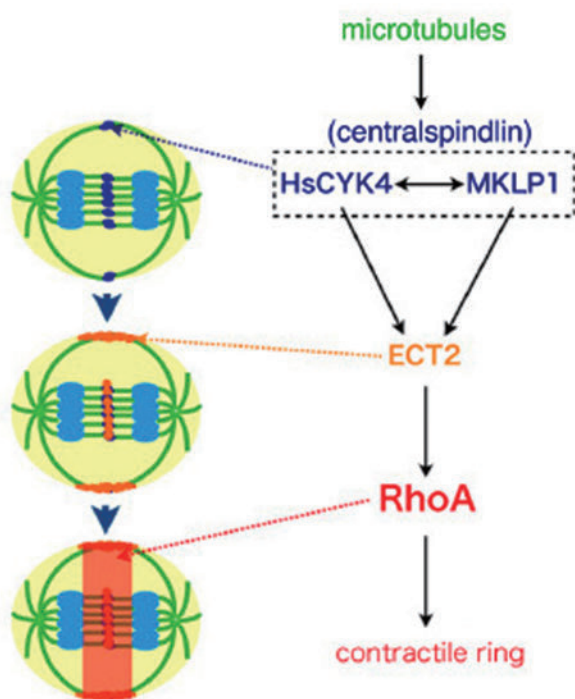


図5：Rhoの局在を指標にして明らかになった微小管から分裂溝収縮までの流れ。微小管 (microtubule) が分裂予定域に centralspindlin を介して Rho 活性化因子 (ECT2) を運び、それが Rho の集積、ミオシンの活性化につながる⁹⁾。

上皮細胞の維持，修復，ライブイメージング

その他に顕微鏡下で細胞が示す挙動として上皮細胞によるシートの形成，その一部の欠損の修復運動，上皮細胞の3次元形態形成などをイメージングという手段を使って解析してきている。

上皮シート内の細胞を顕微鏡下で狙って殺傷する目的で市販のレーザーアブレーションシステムを使用した。フォトリックインストゥルメンツ社のマイクロポイントという製品で，色素顆粒などを持つ個体には細胞を殺傷する目的で使用されていたが，透明で光の吸収の悪い培養細胞に使う例はなかった。実際に細胞内にレーザーによる熱で大きな穴を開けるといようなことはできなかった。しかし，細胞を培養しているガラス表面はレーザーを吸収するようで，そこにレーザーを集光させると，ガラスの破壊，ガラス小片が飛び散って細胞を貫き修復不可能な細胞膜の傷を作るとい順序で細胞を速やかに殺傷することができることがわかった。いわゆる損傷修

復の実験はライブイメージングによって経過を追うものであっても，細胞集団に傷をつけ，おそらく数百の細胞を殺傷，除去し，細胞のなくなった領域に残っている細胞がどのように押し寄せてくるかを1日以上時間をかけて記録していくものがほとんどだった。そうなるそこで見ているものはオープンスペースにいか細胞集団が動いていくかということである。隣の細胞が死んだ時，生きている細胞に何が起って修復を開始しようとするのかについては，顕微鏡下で特定の細胞を狙って殺傷し，その直後からイメージングをする必要がある。ここで開発した方法は，その条件を満たす。また，最小一個の細胞を殺傷できるので，殺傷から修復完了まで通常1時間以内であるため，ライブイメージングで完了までの全過程が追えるというメリットもある。

極性を持つ上皮シートは細胞間にタイトジャンクションを形成し，それにより細胞間の自由な物質の移動を制御している。このタイトジャンクションが担っている働きを上皮のバリア機能と呼び，上皮シートは生体外から生体内の環境を守っている。バリア機能を持つ上皮シートはその中の細胞が死ぬとその細胞に隣接する生細胞の死細胞に接する側にモータータンパクミオシンIIを集積させることがわかっていたが，私たちのシステムでは数分以内に集積が始まることが見えている(図6)。また修復の完了とともに速やかにミオシンIIの集積が消失することもわかった。細胞は隣接する細胞の生と死をどのように峻別しているのか，というのも私の主要なテーマの一つであり，このような実験法を利用しながら現在研究を続けている¹⁰⁻¹²⁾。

上記のタイトジャンクション以外の主要な細胞間接着装置としてアドヘレンスジャンクションがある。これは最も中心的な細胞接着タンパクであるカドヘリンを基盤とする，細胞間の認識，結合，力の伝達に関わる細胞間接着装置である。実際にカドヘリンと複合体を作っている α -カテニンはアクチンフィラメント結合能を持ち，ミオシンIIによる張力をカドヘリン結合により，隣接する細胞に伝えることができる。このアドヘレンスジャンクションはそれにかかる張力が大きいほど発達し，小さいと減弱することを私は見つけ，その制御は α -カテニンがそれにかかる張力によって構造変化し，分子の性質(結合するタンパクとの結合能)が変わるためであることを明らかにした¹²⁾。リガンド，レセプターを介した化学的なシグナルは通常，チャネルによるイオンの流入，Gタンパクの活性化，キナーゼ活性の上昇などによるシ

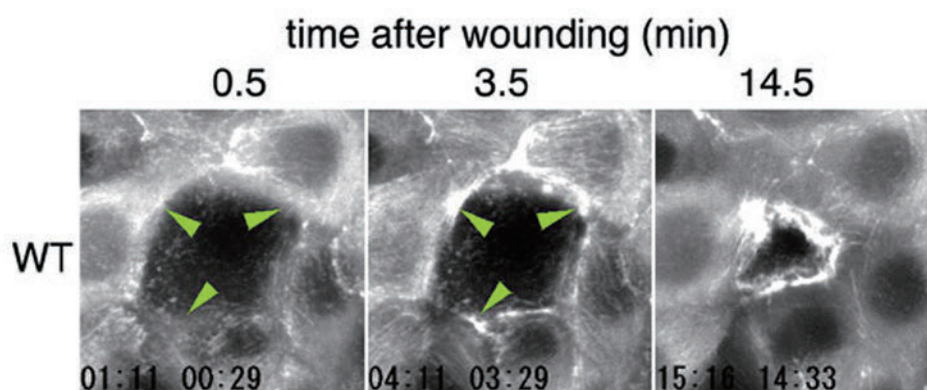


図6：レーザーによる殺傷により隣接する細胞が死んだ直後の生細胞の反応が捉えられる。ミオシンⅡをGFPで可視化したMDCKⅡ細胞。殺傷の3.5分後には集積が始まっている。緑色の三角印で示しているのは死細胞（暗い）と生細胞との境界¹¹⁾。

グナル伝達を経て反応を起こすことが多いため、反応にある程度時間がかかり、また反応が起きる場所もシグナルを捉えた場所に限定されずに細胞全体に広がることも多い。その点張力（力学的シグナル）に対しては、分子が直接構造変化をして性質を変える、というようにシグナルの入力と出力の時間、場所のズレが非常に少ないという特徴があるようだ。隣の細胞から引っ張られれば引っ張り返す、すなわち隣細胞と力のバランスを取っていると考えると、力を伝達するアドヘレンスジャンクション上で力を感じて応答するというのは納得できる。

この α -カテニンがどのように力を感じてどのような構造変化が起こるのかについては構造生物学者との共同研究などにより現在解明が進んできている。面白いことに張力応答性が過敏な α -カテニン変異体を発現する細胞は二次元の上皮シートを作らせると、ほぼ野生型のように細胞間接着を担うことができ、上皮シートもさほど異常には見えないが、細胞の高さは乱れる傾向にあり、細胞を殺傷した時の修復完了にも時間がかかる。 α -カテニンの変異がどうしてそのような差を生むのか、また三次元培養では形態形成にどのような違いをもたらすのか、現在解明を進めている。

おわりに

就任記念講演ということで、徳島大学赴任以前の研究内容を紹介することから、細胞生物学分野でどのような研究が今後なされていくのか、イメージを持ってもらえ

ればありがたい。細胞レベルの研究では個体や組織内では行うことのできない条件の操作が可能ことが多く、また、高精細なライブイメージングも行いやすいなどの有利な点を生かして取り組んでいく必要がある。細胞の研究から個体全体にも非常に重要な現象、またその仕組みを明らかにしていきたいと考えている。

文 献

- 1) Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., *et al.*: Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J. Cell Biol.*, 140: 647-657, 1998
- 2) Tsukita, S., Yonemura, S., Tsukita, S.: ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends Biochem. Sci.*, 22: 53-58, 1997
- 3) Matsui, T., Yonemura, S., Tsukita, S., Tsukita, S.: Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr. Biol.*, 9: 1259-1262, 1999
- 4) Grimbleby, F.H., Ntalianas, H.A.: Binding of trichloroacetic acid by protein. *Nature*, 189: 835-836, 1961
- 5) Hayashi, K., Yonemura, S., Matsui, T., Tsukita, S.: Immunofluorescence detection of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins with their carboxyl-terminal threonine phosphorylated in cultured cells and

- tissues. J. Cell Sci., 112 (Pt8) : 1149-1158, 1999
- 6) Yonemura, S., Hirao-Minakuchi, K., Nishimura, Y. : Rho localization in cells and tissues. Exp. Cell Res., 295 : 300-314, 2004
 - 7) Kishi, K., Sasaki, T., Kuroda, S., Itoh, T., *et al.* : Regulation of cytoplasmic division of *Xenopus* embryo by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI). J. Cell Biol., 120 : 1187-1195, 1993
 - 8) Mabuchi, I., Okuno, M. : The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres. J. Cell Biol., 74 : 251-263, 1977
 - 9) Nishimura, Y., Yonemura, S. : Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. J. Cell Sci., 119 : 104-114, 2006
 - 10) Miyake, Y., Inoue, N., Nishimura, K., Kinoshita, N., *et al.* : Actomyosin tension is required for correct recruitment of adherens junction components and zonula occludens formation. Exp. Cell Res., 312 : 1637-1650, 2006
 - 11) Watanabe, T., Hosoya, H., Yonemura, S. : Regulation of myosin II dynamics by phosphorylation and dephosphorylation of its light chain in epithelial cells. Mol. Biol. Cell, 18 : 605-616, 2007
 - 12) Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A., *et al.* : alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. Nat. Cell Biol., 12 : 533-542, 2010

Cell Biological Approaches

Shigenobu Yonemura

Department of Cell Biology, Tokushima University Graduate School of Medical Science, Tokushima, Japan

SUMMARY

Our cell biological approaches are introduced in this article. First, we show development of a new fixation protocol using trichloroacetic acid (TCA) that is ideal for immunofluorescence microscopy detecting cellular distribution of phosphorylated ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. TCA denatures proteins differently from organic solvents or aldehydes and can be a good alternative to conventional fixatives when immunostaining is not successful. Second, using this new fixation protocol, the small GTPase, Rho was found to be successfully immunostained and this led to understanding of molecular mechanism for determination of the position of the cleavage furrow at cytokinesis through microtubules of the mitotic apparatus. Rho activator is translocated to the presumptive furrow region through microtubules, then, Rho is accumulated and activated there leading to myosin II contractility for furrowing. Third, we show the cell ablation using laser beam during microscopic observation. This enables us to analyze cell responses to the death of neighboring cells in epithelial sheets at early stages.

Key words : trichloroacetic acid (TCA) fixation, Rho, cytokinesis, epithelial sheets